

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-230002

(P2000-230002A)

(43) 公開日 平成12年8月22日 (2000.8.22)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

フィート (参考)

C 0 8 B 37/08

C 0 8 B 37/08

Z 4 C 0 9 0

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願平11-31527

(22) 出願日 平成11年2月9日 (1999.2.9)

(71) 出願人 000003296

電気化学工業株式会社

東京都千代田区有楽町1丁目4番1号

(72) 発明者 橋本 正道

東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化

学工業株式会社中央研究所内

(72) 発明者 新井 一彦

東京都町田市旭町3丁目5番1号 電気化

学工業株式会社中央研究所内

Fターム (参考) 4C090 AA07 AA09 BA67 BD02 BD24

BD31 DA10 DA22

(54) 【発明の名称】 骨修復材

(57) 【要約】

【課題】 ヒアルロン酸自体が本来持っている優れた生体適合性の特徴を最大限生かすために、なんら化学的架橋剤や化学的修飾剤を使用することなく、またカチオン性的高分子と複合体化することなく、安全性及び生体適合性に優れ、更に骨修復を顕著に増進させる骨修復材を提供すること。

【解決手段】 中性水溶液に難溶性であるヒアルロン酸単独で形成されたゲルを含有する骨修復材を構成とする。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 中性水溶液に難溶性であるヒアルロン酸単独で形成されたゲルを含有する骨修復材。

【請求項2】 次の(a)、(b)の要件を満たすヒアルロン酸単独で形成されたゲルを含有することを特徴とする骨修復材。

(a) 中性の37℃の水溶液中で12時間での溶解率が50%以下である、(b) ヒアルロン酸の促進酸加水分解条件下でヒアルロン酸ゲルを処理することで可溶化されたヒアルロン酸が分岐構造を有し、該可溶化されたヒアルロン酸中に、分岐度が0.5以上の分子量フラクシ

ョンを部分的に含む。

【請求項3】 ヒアルロン酸単独で形成されたゲルが、フィルム状、シート状、スラリー状、破砕状、スポンジ状、塊状又はペースト状からなる群より選択した1種であることを特徴とする請求項2記載の骨修復材。

【請求項4】 中性の37℃の水溶液中で12時間での溶解率が50%以下であり、ヒアルロン酸の促進酸加水分解条件下でヒアルロン酸ゲルを処理することで可溶化されたヒアルロン酸が分岐構造を有し、該可溶化されたヒアルロン酸中に、分岐度が0.5以上の分子量フラクシ

ョンを部分的に含むヒアルロン酸ゲルと、ゲル化されていないヒアルロン酸、生理活性物質、骨顆粒、又は抗生物質からなる群より選択した少なくとも1種を含む骨修復材。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、中性水溶液に難溶性であるヒアルロン酸単独で形成されたゲルを含有するヒトまたは動物の骨欠損、損傷及び抜歯等の外科的治療、整形外科手術等に用いられる骨修復材に関する。

【0002】

【従来の技術】生体材料のうち、ブロック状の充填材として、例えば、特開昭62-39506号の多孔質スポンジは、薬剤によりキチンを架橋した充填材である。特開平3-23864号は、コラーゲンスポンジとポリ乳酸からなるブロック状の複合材料である。また、特表平7-505643号は、ヒアルロン酸エステルからなる生体適合性と生体吸収性を有する優れた骨置換剤である。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、前記従来技術には以下のような課題があった。すなわち、特開昭62-39506号の多孔質スポンジは生体内で非吸収性であるため骨自身に完全に置換されないの、感染の危険性および材料自体が離脱してしまう危険性があった。他方、特開平3-23864号の複合材料は、アテロコラーゲンに若干の抗原性があるという不具合がある。

【0004】これら非吸収性と生体適合性の問題点はヒ

アルロン酸を用いることで解決できる。しかし、従来の化学的な改質方法によるヒアルロン酸の骨修復材は、ヒアルロン酸の分子中に架橋物質や金属などを内包するため、その生理作用や生体適合性が本質的にヒアルロン酸と同等であるとはいえず、安全性の問題を完全に回避することは難しかった。

【0005】本発明が解決しようとする課題は、優れた生体適合性や成形性や生体内分解性を有する骨修復材を提供することにある。

【0006】本発明者らは、架橋剤を用いない本質的にヒアルロン酸のみからなる難水溶性ヒアルロン酸ゲルを見出し(PCT/J P98/03536)、今回、この難水溶性ヒアルロン酸ゲルの骨修復材としての有用性を見出し、本発明を完成させるに至った。

【0007】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明は、

(1) 中性水溶液に難溶性であるヒアルロン酸単独で形成されたゲルを含有する骨修復材、(2) 次の(a)、(b)の要件を満たすヒアルロン酸単独で形成されたゲルを含有することを特徴とする骨修復材、(a) 中性の37℃の水溶液中で12時間での溶解率が50%以下である、(b) ヒアルロン酸の促進酸加水分解条件下でヒアルロン酸ゲルを処理することで可溶化されたヒアルロン酸が分岐構造を有し、該可溶化されたヒアルロン酸中に、分岐度が0.5以上の分子量フラクシ

ョンを部分的に含む、(3) ヒアルロン酸単独で形成されたゲルが、フィルム状、シート状、スラリー状、破砕状、スポンジ状、塊状又はペースト状からなる群より選択した1種であることを特徴とする請求項2記載の骨修復材、(4)

中性の37℃の水溶液中で12時間での溶解率が50%以下であり、ヒアルロン酸の促進酸加水分解条件下でヒアルロン酸ゲルを処理することで可溶化されたヒアルロン酸が分岐構造を有し、該可溶化されたヒアルロン酸中に、分岐度が0.5以上の分子量フラクシ

ョンを部分的に含むヒアルロン酸ゲルと、ゲル化されていないヒアルロン酸、生理活性物質、骨顆粒、又は抗生物質からなる群より選択した少なくとも1種を含む骨修復材である。

【0008】

【発明の実施の形態】以下、本発明を詳細に説明する。

本発明という骨修復材とは、ヒトまたは動物の骨欠損、損傷及び抜歯等に於ける骨の欠損組織の成長及び修復を促進するものである。

【0009】また、本発明というヒアルロン酸ゲルとは、三次元網目構造をもつ高分子及びその膨潤体である。三次元網目構造はヒアルロン酸に架橋構造によって形成されている。

【0010】本発明に用いられるヒアルロン酸は、動物組織から抽出したものであっても、また発酵法で製造したものであってもその起源を問うことなく使用できる。発酵法で使用する菌株は自然界から分離されるストレプトコッカス属

等のヒアルロン酸生産能を有する微生物、又は特開昭63-123392号公報に記載したストレプトコッカス・エクイFM-100(微工研菌寄第9027号)、特開平2-234689号公報に記載したストレプトコッカス・エクイFM-300(微工研菌寄第2319号)のような高収率で安定にヒアルロン酸を生産する変異株が望ましい。上記の変異株を用いて培養、精製されたものが用いられる。

【0011】本発明に用いられるヒアルロン酸の分子量は、約 $1 \times 10^5$  ~ 約 $1 \times 10^7$  ダルトンの範囲内のものが好ましい。また、上記範囲内の分子量をもつものであれば、より高分子量のものから、加水分解処理等をして得た低分子量のものでも同様に好ましく使用できる。なお、本発明にいうヒアルロン酸は、そのアルカリ金属塩、例えば、ナトリウム、カリウム、リチウムの塩をも包含する概念で使用される。

【0012】本発明でいうヒアルロン酸単独とは、ヒアルロン酸以外に化学的架橋剤や化学的修飾剤等は使用しないことまた、カチオン性の高分子と複合体化しないことを意味するものである。

【0013】本発明でいうヒアルロン酸ゲルは、ヒアルロン酸の促進酸加水分解反応条件下でヒアルロン酸ゲルを処理することで分解、可溶化することができる。可溶化されたヒアルロン酸が架橋構造を保持している場合、分岐点を有するヒアルロン酸として高分子溶液論的に直鎖状のヒアルロン酸と区別することができる。

【0014】本発明でいうヒアルロン酸の促進酸加水分解反応条件としては、水溶液のpH1.5、温度60℃が適当である。ヒアルロン酸のグリコシド結合の加水分解による主鎖切断反応が、中性の水溶液中と比較して、酸性やアルカリ性水溶液中で著しく促進される。更に酸加水分解反応は、反応温度が高い方が促進される。

【0015】本発明ではGPC-MALLS法を用い、GPCで分離された分子量フラクションの分子量と分岐度をオンラインで連続的に測定した。本発明では、同一溶出体積のフラクションの可溶化されたヒアルロン酸の分子量と対照となる直鎖状ヒアルロン酸の分子量を比較して分岐度を計算する溶出体積法を使って分岐度の測定を行った。分岐度は可溶化されたヒアルロン酸の高分子鎖1コ当たり存在する分岐点の数であり、可溶化されたヒアルロン酸の分子量に対してプロットされる。

【0016】可溶化されたヒアルロン酸は、GPC溶媒で希釈して濃度を調製し、0.2μmのメンブランフィルターでろ過した後測定に供した。本発明でいうヒアルロン酸ゲル中に、ヒアルロン酸の促進酸加水分解条件下でも安定に存在する架橋構造がある場合、可溶化されたヒアルロン酸に分岐構造が高分子溶液論的に確認される。

【0017】以下に、難水溶性ヒアルロン酸ゲルを用いる骨修復材の具体的な例をあげるが、これらの例は例示

として挙げるものであり、中性の37℃の水溶液中で12での溶解率が50%以下であるヒアルロン酸単独で形成された難水溶性ヒアルロン酸ゲルからなる骨修復材であれば、製造方法は何ら制限されるものではない。

【0018】本発明の骨修復材の製造工程の一例を順を追って説明する。ヒアルロン酸の水溶液は、ヒアルロン酸の粉末と水を混合し、攪拌して得られる。ヒアルロン酸の水溶液は、酸性となるように調整することが好ましい。

10 【0019】ヒアルロン酸の水溶液のpHを調整するために使用する酸は、pH3.5以下に調整できる酸であれば、いずれの酸も使用することができる。酸の使用量を低減するために、好ましくは強酸、例えば、塩酸、硝酸、硫酸等を使用することが望ましい。

【0020】ヒアルロン酸の水溶液のpHは、ヒアルロン酸のカルボキシル基が充分な割合でプロトン化するpHに調整する。調整されるpHはヒアルロン酸塩の対イオンの種類、ヒアルロン酸の分子量、水溶液濃度、凍結及び解凍の条件、並びに生成するゲルの強さ等の諸特性により適宜決められるが、本発明では、pH3.5以下、好ましくは、pH2.5以下に調整することである。

【0021】凍結、解凍はヒアルロン酸の酸性水溶液を、任意の容器に入れた後、所定の温度で凍結させ、凍結が終わった後、所定の温度で解凍させる操作を1回以上行う。凍結、解凍の温度は、好ましくは-5℃以下の凍結温度、5℃以上の解凍温度が選ばれ、また、時間は特に制限はない。またその操作の繰り返し回数は1回以上繰り返すことが好ましい。

30 【0022】次に、この難水溶性ヒアルロン酸ゲルは、酸等の成分を除くために洗浄に供される。洗浄に用いる液は特に制限はないが、例えば、水、生理食塩水、リン酸緩衝液等が好適に用いられる。

【0023】また、洗浄方法は、特に制限はないが、通常は、バッチ法、濾過法、カラム等に充填して通液する方法等が用いられる。これらの洗浄条件は、洗浄液量、回数等を含めて、除きたい成分を目標の濃度以下にできる条件であればよく、ヒアルロン酸ゲルの形態や用途により適宜選択することが可能である。

40 【0024】そして、この洗浄した難水溶性ヒアルロン酸ゲルは、溶媒中に浸漬した状態、溶媒を含ませた湿润状態、風乾、減圧乾燥あるいは凍結乾燥等の処理を経た乾燥状態として骨修復材として供される。

【0025】難水溶性ヒアルロン酸ゲルの成形加工等の処理は、作成時には、ヒアルロン酸酸性溶液の凍結時の容器や手法の選択により所望の形態の難水溶性ヒアルロン酸ゲルの修復材の作成が可能である。例えば、容器の形により塊状、スポンジ状の形態が得られる。作成後の加工としては、機械的粉碎による微細な破砕状が例示される。

【0026】さらに、ヒアルロン酸酸性溶液を凍結、解凍する前に、骨顆粒、生理活性物質、及び抗生物質等を混合することにより、それらを包含した難水溶性ヒアルロン酸ゲルの骨修復材を得ることも可能である。また、ヒアルロン酸酸性溶液を凍結、解凍し、洗浄した後、ゲル化されていないヒアルロン酸、骨顆粒、生理活性物質、及び抗生物質等を混合することにより、それらを包含した難水溶性ヒアルロン酸ゲルの骨修復材を得ることも可能である。

【0027】骨顆粒は、ヒアルロン酸と同様に細胞の足場として機能し、骨修復を増進させる機能を有する。また、生理活性物質は、増殖細胞を活性化し、骨修復を加速させる機能を有する。また、抗生物質は骨損傷部位に感染する恐れのある病原菌の増殖を抑える働きを有する。

【0028】骨使用するゲル化されていないヒアルロン酸、骨顆粒、生理活性物質、及び抗生物質等には特に制限はないが、骨修復材料の適用部位が骨、関節、及び歯根等であることから以下のようなものが挙げられる。

【0029】ゲル化されていないヒアルロン酸としては、その起源は何ら制約を受けず、またその各種のアルカリ金属塩をも包含し、また、その分子量の制約も特に無く分子量約 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^7$  ダルトンの範囲まで使用できる。

【0030】生理活性物質としては、骨細胞代謝促進剤として、TGF $\beta$ 、BMP等や、カルシトニン、エルシトニン、サケカルシトニン等が挙げられる。

【0031】骨顆粒としては、天然骨顆粒または人工の骨顆粒としてヒドロキシアパタイト、磷酸トリカルシウム及び炭酸カルシウムの顆粒が挙げられ特に制限されない。一般に、既に通常に使用されているものを使用できる。例えば、該骨顆粒の直径が $50 \mu\text{m} \sim 5 \text{mm}$ であり、また、それらは多孔質または非孔質のいずれを問わない。

【0032】抗生物質の種類は、特に制限されるものではないが、骨炎や骨髄炎に対して有効なものを使用することが好ましい。特にセファレキシン等のセファム系抗生物質、アンピシリン等のペニシリン系抗生物質、ゲンタマイシン等のアミノグリコシド系抗生物質、エリスロマイシン等のマクロライド系抗生物質、ミノサイクロン等のテトラサイクリン系抗生物質、バシトラシン等のペブチド系抗生物質等が挙げられる。

【0033】難水溶性ヒアルロン酸ゲルの骨修復材は、骨の損傷が生じるいかなる動物にも適用でき、哺乳動物、特に人間に於いて好適に骨を修復することができ、難水溶性ヒアルロン酸ゲルの骨修復材は、ペースト状、破砕状、スポンジ状、塊状、スラリー状又はフィルム状等の形態で外科手術に用いられるが、好ましくはペースト状、破砕、スラリー状として注射器で骨損傷部位に直接充填する、また、スポンジ状、塊状として骨損傷部位に挿入するのが好適である。

【0034】

【実施例】以下、実施例により本発明を更に詳しく説明する。なお、本発明はこれにより限定されるものではない。

【0035】実施例1

分子量が $2 \times 10^6$  ダルトンのヒアルロン酸ナトリウムを蒸留水に溶解し、1重量%のヒアルロン酸水溶液を調整した。この水溶液のpHを、1N塩酸でpH1.5に調整し、ヒアルロン酸酸性水溶液を得た。このヒアルロン酸酸性水溶液25mlを、プラスチック製シャーレに入れ、 $-20^\circ\text{C}$ での冷凍2時間と $25^\circ\text{C}$ での解凍2時間を2回繰り返した。次にこれを生理的食塩水に50mM濃度でリン酸緩衝成分を加えて調整したpH7のリン酸緩衝生理的食塩水100mlに $5^\circ\text{C}$ で24時間浸漬した後、蒸留水で十分に洗浄した。そして、これを凍結乾燥し、シート状の難水溶性ヒアルロン酸ゲルの骨修復材を得た。

【0036】実施例2

分子量が $6 \times 10^5$  ダルトンのヒアルロン酸ナトリウムを用いて、実施例1と同様な操作を行い、シート状の難水溶性ヒアルロン酸ゲルの骨修復材を得た。

【0037】実施例3

実施例1の分子量が $2 \times 10^6$  ダルトンのpH1.5のヒアルロン酸酸性水溶液25mlを、プラスチック製シャーレに入れ、 $-20^\circ\text{C}$ での冷凍2時間と $25^\circ\text{C}$ での解凍2時間を2回繰り返した。次にこれを実施例1と同様にリン酸緩衝生理的食塩水浸漬、洗浄した後、オーブンにより $40^\circ\text{C}$ で3時間乾燥し、フィルム状の難水溶性ヒアルロン酸ゲルの骨修復材を得た。

【0038】実施例4

実施例1のシート状の難溶解性ヒアルロン酸50mgを無菌的に10mlの生理的食塩水に入れ、マイクロホモジナイザー(POLYTORON、KINEMATICA AG製)にて粉砕し、スラリー状及び破砕状の難水溶性ヒアルロン酸ゲルの骨修復材を得た。

【0039】実施例5

実施例1の分子量が $2 \times 10^6$  ダルトンのpH1.5のヒアルロン酸酸性水溶液15mlを30mlのガラスビンに入れ、 $-20^\circ\text{C}$ での冷凍2時間と $25^\circ\text{C}$ での解凍2時間を2回繰り返した。これを実施例1と同様にリン酸緩衝生理的食塩水浸漬、洗浄、凍結乾燥し、スポンジ状難水溶性ヒアルロン酸ゲルの骨修復材を得た。

【0040】実施例6

実施例1の分子量が $2 \times 10^6$  ダルトンのpH1.5のヒアルロン酸酸性水溶液15mlを30mlのガラスビンに入れ、 $-20^\circ\text{C}$ での冷凍2時間と $25^\circ\text{C}$ での解凍2時間を2回繰り返した。これを実施例1と同様にリン酸緩衝生理的食塩水浸漬、洗浄し、遠心脱水で押し固めたまま凍結乾燥し、塊状の難水溶性ヒアルロン酸ゲルの骨修復材を得た。

## 【0041】実施例7

実施例5のスポンジ状のヒアルロン酸ゲルをホモジナイザーにより粒径が1mm以下になるまで破碎し、遠心分離により回収した。これを分子量が $2 \times 10^6$ ダルトンの2重量%のヒアルロン酸水溶液に混合することにより、ヒアルロン酸を併用するペースト状の難水溶性ヒアルロン酸ゲルの骨修復材を得た。

## 【0042】比較例1

実施例1で調整したヒアルロン酸水溶液のpHを1N水酸化ナトリウムでpH7.0に調整し、その15mlを30mlのガラスビンに入れ-20℃で凍結して、凍結乾燥してシート状ヒアルロン酸の骨修復材を得た。

## 【0043】比較例2

実施例1で調整したヒアルロン酸水溶液のpHを1N水酸化ナトリウムでpH7.0に調整し、その25mlをプラスチック製シャーレに入れて60℃で風乾し、シート状ヒアルロン酸の骨修復材を得た。

## 【0044】比較例3

実施例1で調整したヒアルロン酸水溶液のpHを1N水酸化ナトリウムでpH7.0に調整し、その25mlをピーカーに入れて-20℃で凍結し、凍結乾燥してスポンジ状のヒアルロン酸の骨修復材を得た。

## 【0045】比較例4

リン酸水素二ナトリウム1.1gを30gの水に溶解し2%水酸化ナトリウムでpH10に調整した溶液に平均分子量60万のヒアルロン酸ナトリウム0.6gを溶解\*

した。塩化シアヌール0.05gを1.5mlのジオキサンに溶解し、上記ヒアルロン酸溶液に添加し3時間室温で反応した。その後、透析膜に入れ、1日間水に対して透析し、その15mlを30mlのガラスビンに入れ凍結乾燥して、スポンジ状の塩化シアヌール架橋ヒアルロン酸ゲルの骨修復材を得た。

## 【0046】実施例8

難水溶性ヒアルロン酸ゲルの骨修復材の溶解性試験  
生理的食塩水に50mM濃度でリン酸緩衝成分を加え、pH7のリン酸緩衝生理的食塩水を調整した。得られた難水溶性ヒアルロン酸ゲルを蒸留水で水洗し、ろ紙上で脱水した。乾燥重量で150mgのヒアルロン酸を含む難水溶性ヒアルロン酸ゲルに対して、50mlのリン酸緩衝生理的食塩水の割合で、難水溶性ヒアルロン酸ゲルをリン酸緩衝生理的食塩水中に浸漬した。37℃でリン酸緩衝生理的食塩水中に溶出するヒアルロン酸の割合を、リン酸緩衝生理的食塩水中のヒアルロン酸濃度から求めた。

【0047】リン酸緩衝生理的食塩水中のヒアルロン酸の濃度は、GPCを使って、示差検出器のピーク面積から求めた。

【0048】上記に従い、実施例1～7および比較例1～3の溶解性試験を行った。その結果を表1に示す。

## 【0049】

## 【表1】

実験 No	難水溶性ヒアルロン酸ゲルの溶解率 (%)				備考
	12時間後	1日後	4日後	7日後	
1	6	15	24	29	実施例1
2	15	21	38	55	実施例2
3	6	18	26	35	実施例3
4	8	14	21	32	実施例4
5	8	16	22	28	実施例5
6	6	15	20	26	実施例6
7	11	18	27	41	実施例7
8	100	100	100	100	比較例1
9	100	100	100	100	比較例2
10	96	100	100	100	比較例3

【0050】表1より、実施例1～7で得られたヒアルロン酸ゲルが中性水溶液に難溶性であることが確認された。

## 【0051】実施例9

難水溶性ヒアルロン酸ゲルの骨修復材の分岐度測定

実施例1～7で得られた難水溶性ヒアルロン酸ゲルを、pH1.5の塩酸水溶液15mlに浸漬し、60℃、6時間の加水分解を行った。ゲルは加水分解により可溶化され、これをGPC溶媒で2倍に希釈して濃度を0.0

5重量%に調製し、0.2μmのメンブランフィルターで濾過した後、0.1ml注入してGPC-MALLSの測定を行った。実施例1～7で得られた難水溶性ヒアルロン酸ゲルの分岐度は、いずれも0.5以上であった。

## 【0052】実施例10

難水溶性ヒアルロン酸ゲルの骨修復材の家兎頭蓋骨欠損モデルによる骨修復治療効果試験

実施例5のスポンジ状の難水溶性ヒアルロン酸ゲルの骨

修復材（直径1cm、高さ3mm）、また、実施例7のペースト状の難水溶性ヒアルロン酸ゲルの骨修復材を以下の試験に供した。また、コントロールとして、生理的食塩水のみを投与する無処置群、及び比較例4の塩化シアヌール架橋ヒアルロン酸を直径1cm、高さ3mmに裁断したものを以下の試験に供した。

【0053】日本白色種家兎（約2.5kg）20匹のうち、5匹をスポンジ状難水溶性ヒアルロン酸ゲル、5匹をペースト状の難水溶性ヒアルロン酸ゲル、比較例として5匹を生理的食塩水投与、残り5匹を塩化シアヌール架橋ヒアルロン酸の埋め込みに用いた。埋め込みは、家兎の頭部の毛を刈り、エーテル麻酔下で頭蓋骨にマイクロドリルを用い骨欠損部（直径5mm）を作製 \*

\*し、各種ヒアルロン酸を骨欠損部に充填し縫合することにより行った。

【0054】埋め込みから9週後に、難溶解性ヒアルロン酸埋め込み家兎と、凍結乾燥ヒアルロン酸埋め込み家兎をと殺後、頭部を切開し、埋め込み部の状態の観察を行い、骨欠損部（直径5mm）が再生され、頭蓋骨が結合されたものを修復したとした。ヒアルロン酸残存率を埋め込んだシート中のヒアルロン酸量を基準として算出した結果を、埋め込み部の状態の観察結果と併せて、表2に示す。

【0055】

【表2】

実験 No	群	骨修復の割合	備考
11	実施例5のスポンジ状難水溶性ヒアルロン酸ゲル	4/5	実施例
12	実施例7のスポンジ状難水溶性ヒアルロン酸ゲル	4/5	実施例
13	無処置（生理的食塩水）	1/5	比較例
14	比較例4の塩化シアヌール架橋ヒアルロン酸	3/5	比較例

【0056】表2より、どの家兎も正常に生育したが、組織の状態は難水溶性ヒアルロン酸ゲル及び凍結乾燥ヒアルロン酸が埋め込み局所の組織の状態に異常は見られなかったのに対し、比較例4の塩化シアヌール架橋ヒアルロン酸では組織の軽微な炎症が認められた。

【0057】

【発明の効果】本発明によれば、ヒアルロン酸単独で形成された難水溶性のヒアルロン酸を含有する骨修復材を提供することができる。かかる本発明の骨修復材は、架橋剤等を使用していないため生体内に存在する本来のヒアルロン酸の構造を維持しており、無毒性及び生体適合性に優れ、更に骨修復を顕著に増進させるものである。